

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18208027
 研究課題名(和文) 生命科学と有機材料科学を基盤とした植物バイオマス資源からの機能性高分子材料の創製
 研究課題名(英文) The production of high functional materials from biomass lignin by the fusion technology of molecular biology and organic material science
 研究代表者
 片山 義博 (KATAYAMA YOSHIHIRO)
 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授
 研究者番号：10214339

研究成果の概要：

本研究は生命科学と有機材料科学を基盤に、リグニンやタンニンなど複雑な化学構造を持つ植物バイオマス成分から、微生物機能を用いて一旦単純な構造の中間物質 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) に高収率変換し、テレフタル酸、L-乳酸、コハク酸等と重縮合させる事により機能性高分子材料を設計生産する新しいリグニン利用技術を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：植物バイオマス, リグニン, タンニン, 微生物, 遺伝子工学, バイオリクター, 機能性有機材料, バイオプラスチック

1. 研究開始当初の背景

(1) 石油など化石資源に依存した産業システムから、再生可能なバイオマス資源を基盤とする循環型産業システムへの移行が 21 世紀の重要課題となっている。その実現には、現在の石油化学が生産している様々な製品を、石油に代わってバイオマス資源から生産する新しい高度なバイオマス利用技術の開発がその鍵を握っている。植物バイオマスを構成する細胞壁の主要成分のうち、セルロースやヘミセルロースなどの糖成分は古来より紙として、近代では繊維や甘味料、医薬品等への利用技術が幅広く蓄積されて来た。一方、リグニンは主要な細胞壁成分として大量に生産されているにも係わらず、その化学構造の複雑さや取り扱い難さを反映してそ

の利用は非常に限られて、濃縮後燃焼され重油の代替エネルギーとして発電に利用されたり、染料の分散剤、鉛蓄電池の負極添加材、土壌改良剤として利用されているにすぎない。

(2) 20 世紀の発展を支えた石油化学は、地中深くから採掘され多様な成分の混合物である原油を、触媒分解と分溜によってエチレンやキシレンなどの中間物質として一旦精製し、それらの中間物質の物理化学的特性に基づき様々な繊維やプラスチックを設計生産している。原油を混合物の状態で利用するのでは、精緻な物理化学特性が求められる機能性材料を生み出す事はできない。この事は、植物バイオマス利用においても重要な技術課題である。複雑な化学構造から構成される芳香族高分子リグニンをそのま

ま用いる事によっては、精緻な物理化学的特性が求められる様々な繊維やプラスチックなどの機能性材料の生産は難しい。多様なリグニン低分子混合物を一旦特定のポリマー化可能な中間物質への変換技術が開発されれば、リグニンから石油化学に匹敵する様々な機能性材料を柔軟に設計生産する新しいリグニン利用技術が実現可能である

2. 研究の目的

(1)本研究の目的は、生命科学と有機材料科学を基盤に、リグニンやタンニンなど複雑な化学構造を持つ植物バイオマス成分から、高付加価値を持つ新規高分子材料を生産するバイオマス利用技術を確認する事である。現在の石油化学によって生産される機能材料に匹敵する製品を植物バイオマスから生産するには、複雑な植物バイオマス成分を一旦特定の「中間物質」に高収率で変換し、その中間物質の物理化学特性に基づいて高分子材料を設計・合成して用途開発する必要がある。

(2)本研究の第一の目的は、微生物の多様な代謝機能を遺伝子工学により設計・集積した新しいバイオリクターを開発して、多様な植物材料に含まれるリグニンやタンニンなどから、様々なプラスチック材料へ展開が可能な有望な中間物質 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) への高収率変換技術を確認する事である。本研究の第二の目的は、リグニンやタンニンなど植物バイオマス成分から得られた PDC を原料に新しい機能性高分子材料を設計・合成して新しい用途開発を行なう事である。さらに本研究は、石油化学とバイオマス利用技術の融合的発展を目的に、ペットボトル原料であるテレフタル酸からの PDC 生産技術を開発して石油資源利用からバイオマス資源利用への移行技術を構築する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1)間伐材など植物バイオマス資源から PDC 生産のための前処理技術の開発

各種の植物材料に含まれる細胞壁リグニンは高分子構造を有し、そのままでは PDC への変換に利用できない。細胞壁中の高分子リグニンのアルカリ分解による低分子化を行ない、PDC へ変換可能なリグニン低分子成分(バニリン、バニリン酸、シリンガアルデヒド、シリンガ酸、p-ヒドロキシベンズアルデヒド、p-ヒドロキシ安息香酸)の混合物の高収率生産条件を検討する。茶殻に含まれるタンニンは、蒸煮爆砕処理を行ない PDC 生産可能な低分子として単離する。

(2)リグニン低分子混合物からの PDC 生産の

ための遺伝子組換えバイオリクター開発

高分子リグニンのアルカリ分解による低分子化処理で得られる、PDC への変換可能なリグニン低分子混合物から、高い収率で中間物質 PDC に変換可能な遺伝子組換えベクターを *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 の酵素遺伝子を用いて構築する。さらに適切な宿主に導入して遺伝子組換え PDC 高生産バイオリクターを構築し PDC の大量生産を行なう。

(3)PDC を骨格とする新しい機能性高分子材料の設計と生産

遺伝子組換えバイオリクターによって大量調製された PDC を効率的に精製するために、発酵上澄み液への NaCl 溶液添加により容易に単離される難溶性 PDC 複塩の精密な構造解析を行う。PDC を酸クロリドやジオールエステルに変換する経路を確認する。これらの有用中間体を原料とする重縮合系のグリーンポリマー・プラスチックを合成し、接着性、成形性、熱安定性、力学特性、易(生)分解性などの物性を調査して、新規なバイオポリマーを設計合成する。

(4)石油化学からバイオマス利用への移行技術の開発：テレフタル酸から PDC の生産技術

テレフタル酸を唯一の炭素源として生育可能で、PDC を代謝中間体として生成する微生物を単離して、テレフタル酸分解微生物の代謝経路の解析とそれに関与する酵素遺伝子系の解析を行なう。それらの情報に基づきテレフタル酸から PDC を高い収率で生産可能な遺伝子組換えベクターを構築する。さらに適切な宿主に導入して遺伝子組換え PDC 高生産バイオリクターを構築し PDC の大量生産を行なう。

4. 研究成果

(1)「間伐材など植物バイオマス資源から PDC 生産のための前処理技術の開発」の主な成果

高分子リグニンのアルカリ分解は、10ml 容ステンレスオートクレーブに木紛またはリグニン試料 (300mg)、2N 水酸化ナトリウム (7ml) ニトロベンゼン (0.4ml) を加え 170℃、2.5 時間酸化分解を行った。茶殻の蒸煮・爆砕処理は、処理温度を 100, 120, 140, 160, 180, 200℃、処理時間を 10 分に設定し茶葉の蒸煮処理を行った。

蒸煮爆砕処理条件を 140℃以上にすることに、茶葉・茶殻に 10%程度含まれるカテキン類から PDC 原料となりうるガリク酸を高収率で分離する事が可能となった。(図 1)

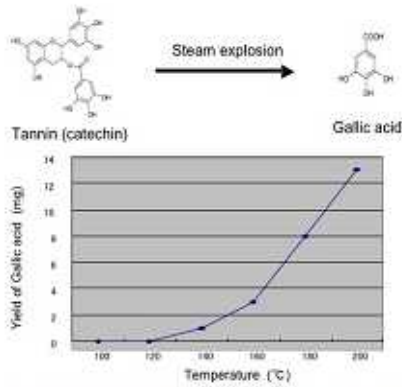


図1. 茶殻・茶葉の蒸気爆砕処理によるガリック酸の単離

スギ木粉及、針葉樹サルファイトリグニン (LSA)、針葉樹クラフトリグニン試料を用いて、アルカリ酸化分解法の検討を行った。アルカリ酸化分解時にニトロベンゼン (NB) を添加する事により、サルファイトリグニンで約 2 倍、スギ木粉では約 11.8 倍分解効率の改善が認められた (図 2)。

ニトロベンゼンを添加したアルカリ分解条件の検討から、スギからはリグニンあたり 27%、木材あたり 8-9% のバニリン・バニリン酸を得ることができ、シラカバからはリグニンあたり 43%、木材あたり 10% のバニリン・バニリン酸・シリンガアルデヒド・シリンガ酸を得ることができた (図 2)。

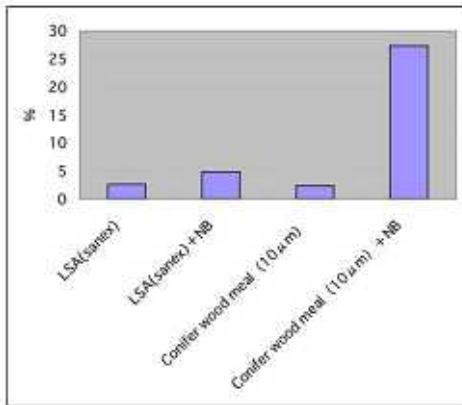


図2. スギ木粉および高分子リグニンのアルカリ分解によるバニリン、バニリン酸の生成とニトロベンゼンの添加による収率改善

(2) 「リグニン低分子混合物からの PDC 生産遺伝子組換えバイオリクター開発」の主な成果

植物細胞壁に含まれる高分子リグニンから高収率で中間物質 PDC に変換するプロセスを開発した。上記(1)で示された様に、リグニンはアルカリ分解による低分子化処理で、植物種によるが高分子リグニンの 40%以上が PDC へ変換可能な成分として得ることができる。高分子リグニンのアルカリ分解物から、一度に高い収率で中間物質 PDC に変換可能なリグニン変換ベクター (pKT-LigA) の構築に成功した (図 3)。

pKT-LigA は、バニリンやシリンガアルデヒドな

どの酸化酵素遺伝子 *ligV*、バニリン酸やシリンガ酸の脱メチル化酵素遺伝子 *vanAB*、p-ヒドロキシ安息香酸からプロトカテク酸への変換酵素遺伝子 *pobA*、プロトカテク酸および 3-メチルガリック酸から PDC への変換酵素遺伝子 *ligABC* から構成される。

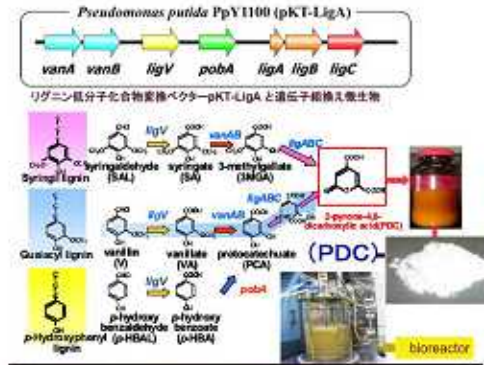


図3. リグニン変換ベクター (pKT-LigA) の構造とバイオリクターによる PDC 生産

pKT-LigA は、*Pseudomonas putida* PpY1100 などの適切な宿主に導入し、150 L の発酵槽を用いて十分増殖させ、その後リグニン低分子混合物を添加すると。リグニン低分子混合物は完全に PDC に変換された (150L の発酵槽では、約 36 時間で約 2 kg の PDC 生産が可能である) (図 3)。

(3) 「PDC を骨格とする新しい機能性高分子材料の設計と生産」に関する主な成果

難溶性 PDC 複塩が、ナトリウムイオンに対する配位結合と加水配位水素結合が交差した非常に珍しい斜方晶型三次元結晶であることを見出した。その結果、多量の発酵残渣を含む培養液から、先ず難溶性 PDC 複塩として単離し、その後 PDC 複塩を酸分解しながら溶剤抽出することにより、85% を超える高い収率で高純度 PDC を精製する事に成功した (図 4)。

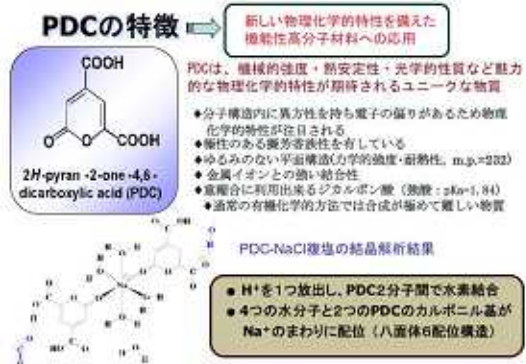


図4. PDCの化学構造と物理化学的特性とNaCl複塩の結晶構造の特徴

PDC の有用中間体として酸クロリドならびにジオールエステルを選び、前者は相間移動触媒存在下での塩化チオニルとの反応で、後者は過剰のエタンジオールとの反応から再結晶生成により、いずれもほぼ定量的に合成する経路を確立した。これらの中間体は、本研究で実施され

た重縮合系以外にも広く適用できるものであり、高い波及効果を持つと考える。

PDC/PDC ジオールエステル/スド・ビシアルレブテート(BHT)の三元共重縮合により、PDCとテレフタル酸(TP)単位を有するバイオソースコポリエステルを開発した。多くのバイオプラスチックが200以下で分解あるいは軟化あるいは溶解するのに対し、本コポリエステルはPDC環の擬芳香族性により240程度まで安定であった。

コポリエステルはホットメルト成型が可能であったが、金属・ガラス・カーボン材料・ポリイミドなどの極性表面に強く接着することを見出した。コポリエステルのPDC含量に依存して、鉄・ステンレス・アルミでは最大6050MPa (=600500kg力/cm²)の強力な接着力を発揮した。また、材料破壊が起きるためガラスやカーボン材料では正確に求められないが、30MPaを超え

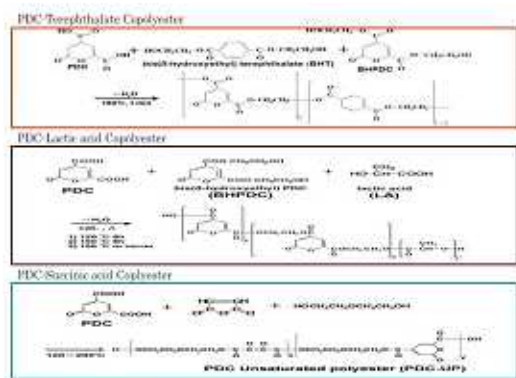


図6. 本研究で合成に成功したPDCを骨格とする高分子ポリマー

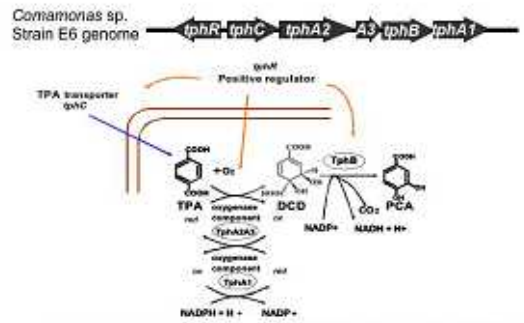
上述のコポリエステルは金属に対する親和性が良いことから、カーボン、銅、銀の微粒子ないしナノワイヤ類をフィラーに用いて検討したところ、銀ナノ粒子を配合したコンポジットにて10⁻²S/cm以上の導電性と20MPaに達する接着力を併せ持つ導電性コンポジットが実現できた。汎用のドータイトが10⁻³S/cm、約12MPa程度である事と比べて十分な性能を有するといえる。

PDC/PDC ジオールエステル/乳酸ないしPDC + コハク酸/ブタンジオールの共重縮合系で、10~40繰り返し単位あたりPDC骨格を1個有するコポリエステルを合成し、フィルム成形能/力学強度の改善された比較的柔軟なコポリエステルの開発を試みた。その結果、PDC単位を含まないポリ乳酸ないしポリブチレンスクリニート(商品名ビオノーレ)と比較して、いずれも力学強度が高くなり、かつ生分解性が大幅に改善された。これにより、力学強度と生分解性を兼ね備えた汎用フィルム材料を生産できた(図6)。

(4)「石油系資源テレフタル酸からのPDC生産技術の開発」に関する主な成果

政井らにより単離されたテレフタル酸分解微生物 *Comamonas* sp. E6株の、代謝経路を解明しそれに関連する酵素遺伝子を単離解析した。テレフタル酸は、*Comamonas* sp. E6

株によりプロトカテク酸を経由してPDCを生成する代謝経路で分解される事を明らかにした。テレフタル酸からプロトカテク酸への変換は、TphA1とTphA2,A3の成分から構成されるTPA 1,2-ジオキシゲナーゼによって行なわれており、それらの酵素遺伝子の単離解析に成功した(図7)。



Comamonas sp. Strain E6株のテレフタル酸からPCAへの変換に関する酵素遺伝子

図7. 本研究で単離解析した *Comamonas* sp. Strain E6株のテレフタル酸分解酵素遺伝子の構造と機能

Comamonas sp. E6株のPCA 4,5-開裂系酵素遺伝子のすべてを含 *orf1-orf2-pndEFDABC* を単離し各遺伝子領域の機能解析に成功した。またテレフタル酸(TPA)からPDCへの効率的変換系を確立するために、プロトカテク酸(PCA)からPDCへの変換に関与する *ligABC* 遺伝子を含むプラスミドにTPAからPCAへの変換を担う *Comamonas* sp. E6株由来の *tphA2A3BA1* 遺伝子を導入し、プラスミド pDB96F を構築した(図8)。

Comamonas sp. E6株のPDCヒドロラーゼ遺伝子 *pndD* を欠損させた *pndD*破壊株(DP1株)を製作した。pDB96Fを保持するDP1株の休止細胞を用いてTPAからPDCへの変換能を調べた結果、テレフタル酸からのリッター当たり9g(収率95%以上)の高収率PDC生産法を確立する事に成功した(図8)。

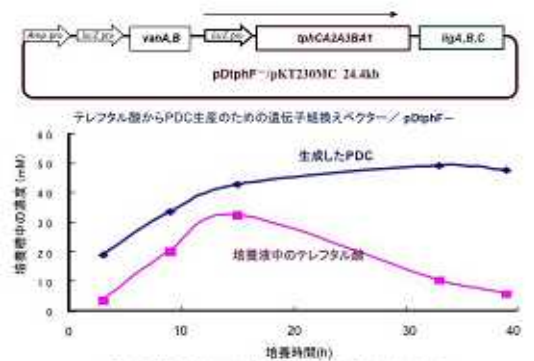


図8. テレフタル酸からPDC生産のための遺伝子組換えベクター-pDtpH-Fと10リッター発酵槽でのテレフタル酸からPDC生産

(5)得られた成果の総括と今後の展望

本研究の第一の成果は、片山、政井らにより行なわれたリグニンの微生物分解に関する分子生物学の成果に基づき、多様な構造を有するリ

グニン低分子構造をことごとく中間物質 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) に一旦変換可能な微生物機能を遺伝子工学基盤技術によって高収率リグニン変換バイオリクターとして創出した所にある。それによって本研究は、石油化学に匹敵し得る新しいリグニン利用技術の可能性を拓き、国内外においてこれまでにない独創的リグニン変換技術として確立できた。

本研究の第二の成果は、高収率リグニン変換バイオリクターにより生産される PDC が、石油化学に前例の無い新しい物理化学的特性が期待される物質であり、ジカルボン酸構造を有しポリアミド、ポリエステル、ポリウレタンなど様々なプラスチック材料へ展開が可能な有望な中間体として、リグニン低分子混合物より大量生産およびその精製技術を確立した事である。

本研究の第三の成果は、PDC を基本骨格とした各種ポリエステル、ポリアミド、ポリウレタンの合成法を確立すると共に、ポリ乳酸 (PLA) や、コハク酸ポリマー (PBS) へ PDC 鎖を導入する事により、力学的特性や耐熱性が改善した新しいプラスチックの合成に成功した事である。そのうち PDC ポリエステルは、金属 (鉄、銅、アルミ)、ガラス、アルミナ、各種プラスチックなど異種材料間でも強力な接着力し、ステンレススチール同士の接着で 90MPa の高性能接着剤の開発に成功しており、リグニンからの新しい機能性複合材料の開発が可能と成った。

石油など化石資源に依存した産業システムから、再生可能なバイオマス資源を基盤とする循環型産業システムへの移行を実現するためには、その過程を支える移行技術の構築が不可欠である。本研究では、リグニンから生産される中間体 PDC を石油由来製品であるペットボトルの循環利用技術と融合させる事に成功した。ペットボトルから再生されるテレフタル酸から高収率で PDC 生産可能なバイオリクターの構築に成功した。

以上本研究の成果は、現在の石油化学によって生産される機能材料に匹敵する製品を、生命科学と有機材料科学を基盤に、リグニンやタンニンなど複雑な化学構造を持つ植物バイオマス成分から生産するこれまでに類のないバイオマス利用技術の可能性を実証し、21世紀の重要課題である石油など化石資源に依存した産業システムから、再生可能なバイオマス資源を基盤とする循環型産業システムへの移行を可能にする新しい高度なリグニンの利用技術の可能性を世界に先駆けて示すことができた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件) (主要な 6 編)

M Hishida, K Shikinaka, Y Katayama, S Kajita, E Masai, M Nakamura, Y Otsuka, S

Ohara, K Shigehara "Polyesters of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC) as bio-based plastics exhibiting strong adhering properties" *Polymer J*, 41, 297-302 (2009) 査読有

Y Fukuhara, D Kasai, Y Katayama, M Fukuda, E Masai "Enzymatic properties of terephthalate 1,2-dioxygenase of *Comamonas* sp. strain E6" *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 2335-2341 (2008) 査読有

T Michinobu, Y Inazawa, K Hiraki, Y Katayama, E Masai, M Nakamura, S Ohara, K Shigehara "A novel biomass-based polymer prepared from lignin-derived stable metabolic intermediate by copper(I)-catalyzed azide-alkyne click reaction" *Chem Lett*, 37, 154-155 (2008) 査読有

E Masai, Y Katayama, M Fukuda, "Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds" *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1-15 (2007) 査読有

T Michinobu, M Bito, Y Yamada, Y Katayama, K Noguchi, E Masai, M Nakamura, S Ohara, K Shigehara, "Molecular properties of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC) as a stable metabolic intermediate of lignin isolated by fractional precipitation with Na⁺ ion" *Bull Chem Soc Jpn* 80, 2436-2442 (2007) 査読有

Y Ohtsuka, M Nakamura, K Shigehara, K Sugimura, E Masai, S Ohara, Y Katayama "Efficient production of 2-pyrone 4,6-dicarboxylic acid as a novel polymer-based material from protocatechuate by microbial function" *Appl Microbiol Biotech*, 71, 608-614, (2006) 査読有

[学会発表] (計 30 件) (主要な 5 件)

Y Fukuhara, E Masai, Y Katayama, M Fukuda "Enzymatic Properties of terephthalate 1,2-dioxygenase from *Comamonas* sp. strain E6" American Society for Microbiology, General 107th Meeting, May, 22-24, 2007, Toronto, Canada.

Y Otsuka, M Nakamura, E Masai, S Ohara, S Kajita, K Shigehara, Y Katayama, "Production of novel polymer-based material from lignin derivatives by microbial function" International Congress on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, June, 10-16, 2007, Madison, Wisconsin, USA

K Mase, Y Otsuka, E Masai, M Nakamura, S Kajita, M Fukuda, S Ohara, K Shigehara, Y Katayama "Bioconversion of lignin-related compounds to a novel polymer material, 2-oxopyran-2H-2,6-dicarboxylic acid" 11th Cell Wall Meeting, August 13, 2007, Copenhagen

T Michinobu, Y Inazawa, M Bito, Y Ohtsuka, M Nakamura, E Masai, S Kajita, Y Katayama, S Ohara, K Shigehara "Selective

Na⁺ ion complexation by biomass-based linear polymers prepared from lignin-derived stable intermediate” 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes, August 29, 2007, Fukuoka

大塚祐一郎、中村雅哉、杉村耕介、政井英司、重原淳孝、片山義博、大原誠資 “生命科学と有機材料科学を基盤としたリグニンの新しい高度利用に関する研究(I)” 第51回リグニン討論会、2006. 10.27, 札幌

[産業財産権]

出願状況 (計4件)

産業財産権の名称: ポリエステル、ポリウレタン及びそれらの製造法

発明者: 片山義博、重原淳孝、高島宏明、山本裕輔、間瀬浩平、下俊久、阿部友邦、政井英司、大原誠資、中村雅哉、大塚祐一郎

出願人: 東京農工大学、長岡技術科学大学、森林総合研究所、(株)豊田自動織機

産業財産権の種類、番号: 特願: 2008-235504

出願日: 2008.09.12

国内外の別: 国内 (未公開)

産業財産権の名称: エポキシ樹脂組成物及びその製造方法

発明者: 片山義博、重原淳孝、山本裕輔、政井英司、大原誠資、中村雅哉、大塚祐一郎

出願人: 東京農工大学、長岡技術科学大学、森林総合研究所、(株)豊田自動織機

産業財産権の種類、番号: 特願2008-226284

出願日: 2008.09.03

国内外の別: 国内

産業財産権の名称: 組換えプラスミド、形質転換体及び2H-ピラン-2-オン4,6-ジカルボン酸の製造法

発明者: 片山義博、梶田真也、重原淳孝、村瀬仁俊、間瀬浩平、大原誠資、中村雅哉、大塚祐一郎、福田雅夫、政井英司

出願人: 東京農工大学、長岡技術科学大学、森林総合研究所、(株)豊田自動織機

産業財産権の種類、番号: 特願 2007-255636

出願日: 2007.09.28

国内外の別: 国内

産業財産権の名称: PDC-乳酸コポリエステル及びその成形体

発明者: 片山義博、重原淳孝、間瀬浩平、下俊久、大原尚己

出願人: 東京農工大学、(株)豊田自動織機

産業財産権の種類、番号: 特願 2008-522330 / WO2007/148471

出願日: 2007.04.17

国内外の別: 国内及び国外

[その他]

新春学長記者会見

(東京農工大学学長, 平成21年1月22日)

会場: 東京商工会議所 東京都千代田区丸の内3-2-2 「植物体からエポキシ樹脂の3倍の強度をもつ接着剤を開発」

新聞報道

日刊工業新聞 (2009.1.23)

日経産業新聞(2009.1.23)

ネット、ホームページ

日経 BP バイオテク(WEB) 植物体から接着剤)

http://biotech.nikkeibp.co.jp/bionews/detail.jsp?id=20059028&newsid=SPC2009012261420&pg_nm=1&sai=1&new1=1&news1=1&icate=0&yunw=1

長岡技術科学大学広報誌 VOS :(http://www.nagaokaut.ac.jp/j/annai/vos/vos_149.pdf)

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山 義博 (KATAYAMA YOSHIHIRO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授、研究者番号: 10214339

(2)研究分担者

重原 淳孝 (SHIGEHARA KIYOTAKA)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授、研究者番号: 60170867

政井 英司 (MASAI EIJI)

長岡技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号: 20272867

中村 雅哉 (NAKAMURA MASAYA)

森林総合研究所・きのこ微生物研究領域・

微生物機能解析チーム長

研究者番号: 50353793

大原 誠資 (OHARA SEIJI)

森林総合研究所・バイオマス化学研究領域・

領域長

研究者番号: 20353617

梶田 真也 (KAJITA SHINYA)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准

教授、研究者番号: 40323753

(3)連携研究者

なし